

Aus dem Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Justus Liebig-Universität Giessen

Die Serum Hydroxyprolin-Konzentration
während der postpartalen Involution
bei Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Alfred Münch
aus Hümme

Giessen 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Justus Liebig-Universität Giessen

Die Serum Hydroxyprolin-Konzentration
während der postpartalen Involution
bei Kaninchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Alfred Münch
aus Hümme

Giessen 1974



Dekan: Prof. Dr. D. Ringleb

Referent: Prof. Dr. P. Bailer

Korreferent: Prof. Dr. L. Róka

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Ganz besonders möchte ich mich für die Unterstützung durch Herrn
Dr.H.Hertel,Fulda und Herrn Prof.Dr.P.Bailer,Giessen bedanken.

Gliederung:

	<u>Seite</u>
1.0 Einleitung	2
1.1 Hydroxyprolinstoffwechsel	2
1.2 Kollagen, Aufbau und Synthese	4
1.3 Uteruskollagen	6
1.3.1 Involution des Uterus	9
1.4. Fragestellung	13
2.0 Hydroxyprolinbestimmung und Tierversuche	14
2.1 Methode der Hydroxyprolinbestimmung	14
2.2 Tierversuche	15
2.3 Blutgewinnung	17
2.4 Hydroxyprolinbestimmung	18
2.4.1 Reagenzien	18
2.4.2 Geräte	19
2.4.3 Analysengang	20
3.0 Ergebnisse	22
3.1 Auswertung der Ergebnisse	22
3.2 Statistische Auswertung	25
3.2.1 Zusammenstellung von Abbildungen und Tabellen	32
4.0 Diskussion	47
5.0. Zusammenfassung	57
6.0 Literaturverzeichnis	59
7.0 Lebenslauf	68

1.0 Einleitung

Chemische Untersuchungen des Kollagenproteins des puerperalen Uterus im Vergleich mit normalem Uterusgewebe einer Nulliparen ergaben eine starke Denaturierung des Kollagens sowie eine vermehrte Freisetzung des löslichen Kollagenanteils (22).

Während der postpartalen Involution erfolgt eine rasche Rückbildung des Kollagengehaltes des Uterus beim Menschen wie auch beim Säugetier (8,31,44,45, 46,53,54).

1.1 Hydroxyprolin-

stoffwechsel

Über den Aufbau des Kollagens sind bisher zahlreiche chemische und morphologische Arbeiten erschienen. Dagegen ist über seinen Abbau wenig bekannt.

Die Aminosäure Hydroxyprolin ist fast ausschließlich im Kollagen enthalten, nur in geringer Menge im Elastin (29).

Die Meinung, daß Hydroxyprolin im Stoffwechsel eine Endstufe darstellt, wird heute nicht mehr vertreten (35,36).

95% des Hydroxyprolins oder mehr werden als Peptid ausgeschieden, weniger als 5% als freie Aminosäure (54), eine Ausnahme bilden Kinder bis zu etwa einem halben Jahr, bei denen bis zu 45% des Gesamthydroxyprolins aus freiem Hydroxyprolin bestehen können (29).

Die Ausscheidung erfolgt zum größten Teil mit dem Urin und nur zum geringen Teil in die Faeces (48).

Die im Urin ausgeschiedenen Hydroxyprolinpeptide und die freie Aminosäure werden nur beim Kollagenabbau freigesetzt. Das geht schon daraus hervor, daß Patienten bei hydroxyprolinfreier Diät fortlaufend beachtliche Mengen Hydroxyprolin ausscheiden, welches überwiegend peptidgebunden ist (54).

Hydroxyprolin entsteht ausschließlich durch Hydroxylierung von Prolin im Polypeptidverband, das heißt im Protokollagen (24,35).

Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob bei der Biosynthese des Hydroxyprolins der normale Syntheseweg über Hydroxyprolin-sRNS überhaupt existiert.

Durch Isotopenstudien konnte auch weitgehend das Schicksal oral aufgenommenen Hydroxyprolins geklärt werden.

So fand Stetten (48), daß gefüttertes Hydroxyprolin, das mit N^{15} markiert wurde, zum größten Teil abgebaut wurde, wobei sich das N^{15} in Glutaminsäure, Asparaginsäure und Arginin wiederfand. Nur geringe Mengen des verfütterten Hydroxyprolins fanden sich bei Ratten in körpereigenen Proteinen wieder.

Hydroxyprolin besitzt ferner glucoplastische Eigenschaften, d.h., daß es eine weitere Umwandlung über das Glutamat zu Oxalacetat und damit zur Glucose durchgemacht bzw. zum Pyruvat über Glyoxalat zum Oxalat (36).

1.2 Kollagen

Aufbau u. Synthese

Kollagen bildet den Hauptbestandteil des Stütz- und Bindegewebes, vor allem der Haut und der organischen Substanz des Knochens. Es hat die Fähigkeit rasch im Extrazellulärraum Fasern zu bilden, die reißfest, quellbar und für die normalen Enzyme des Organismus unangreifbar sein sollen (4).

Die kollagene Bindegewebsfaser besteht aus einer 1. geformten (Mikrofibrille) und einer 2. ungeformten (Grundsubstanz=Kittsubstanz) Komponente (49).

Zu 1.

Von den Fibroblasten gebildete Kollagenmoleküle treten zu Mikrofibrillen zusammen, die sich zu Micellen ordnen (30).

Die Mikrofibrillen bestehen zu 90% aus dem Skleroproteid Kollagen und unterscheiden sich elektronenmikroskopisch von allen anderen Proteinen durch eine periodische Querstreifung entlang der Längsachse im Abstand von $640 \text{ \AA}$.

Vom reifen Kollagen scheint man das Prokollagen abtrennen zu dürfen, das wohl mit dem Tropokollagen identisch ist. Sein Anteil nimmt mit zunehmendem Alter der Bindegewebsfaser ab (26).

Reifes Kollagen stellt ein Material mit sehr niedriger Stoffwechselrate dar (33).

Die Kollagenbiosynthese ist in jungen Organismen sehr intensiv, während mit zunehmendem Alter der unlösliche Anteil auf Grund der abnehmenden Syntheserate

und damit auch die Quervernetzung zunimmt (4,51).

Die räumliche Anordnung der Mikrofibrille ist so geschaffen, daß lange kollagene Fadenmoleküle für kurze Strecken durch parallelen Verlauf gegen die Umgebung ringförmig abgegrenzte Fibrillenbündel bilden, sich wieder aufzweigen und erneut an derartigen Bildungen teilnehmen (41).

Auf Grund des Vernetzungsgrades lassen sich mit Hilfe der Ultrazentrifuge drei Kollagentypen unterscheiden. Eine α , β u. γ Komponente (4). Auf Einzelheiten soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

Zu 2.

Die Grundsubstanz, ebenfalls ein Produkt der Fibroblasten, besteht aus Proteinen, sauren und neutralen Kohlenhydraten (12).

Der Kontakt zu den Mikrofibrillen erfolgt nach den Vorstellungen von Loeven und Bungenberg de Jong über ein Trikomplexsystem (2): Kollagen-Mucopolysaccharide-Kationen in Abhängigkeit vom jeweiligen Ionenmilieu. Reifes Kollagen hat mit einer Halbwertszeit von etwa 100 Tagen und länger einen wesentlich langsameren Stoffwechsel (turn over) als die neutral-salzlöslichen Vorstufen, deren Halbwertszeit nur zwei bis drei Tage beträgt (33).

1.3. Uterus- kollagen

In Corpus und Collum uteri finden sich zwei verschiedene Typen kollagener Bindegewebsfasern. Sie unterscheiden sich durch den im Collum wesentlich größeren Grundsubstanzgehalt.

Für Corpus und Collum uteri werden zwei primär verschiedene Fasertypen postuliert, deren biologischer Sinn im abgestuften Adaptationsvermögen des kollagenen Bindegewebes entsprechend seiner unterschiedlichen Beanspruchung in beiden Uterusabschnitten liegt (49).

Diese Unterschiede finden auch im Verhalten der Bindegewebsfasern alternder Uteri ihren Ausdruck; Altersveränderungen sind im Collum weit stärker als im Corpus uteri.

Aus dieser Sicht stellt sich das Problem der Muttermundsöffnung bei "alten Erstgebärenden" als eine Adaptationsinsuffizienz des kollagenen Bindegewebes der Cervix dar (49).

Während der Schwangerschaft nimmt das prozentuale Grundsubstanzvolumen durch Wasseraufnahme und verzögerte Kollagenbildung erheblich zu. Dadurch wird die Dichte der aus fast reinem Kollagen bestehenden Mikrofibrillen in der Flächeneinheit des Faserquerschnittes geringer. Für die mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes bedeutet dies erhöhte Dehnbarkeit, aber verminderte Elastizität und Reißfestigkeit der Fasern (49).

Cretius vermutet als Ursache für die funktionelle Anpassung des kollagenen Bindegewebes Veränderungen der Grundsubstanz, nicht aber der Mikrofibrillen, nachdem er in der Schwangerschaft keinen Umbau des Kollagens nachweisen konnte (5).

Die erhöhte Dehnbarkeit des Uterus während der Schwangerschaft ist vor allem dafür verantwortlich, daß eine Volumenzunahme um das 800fache erfolgen kann ohne daß der intrauterine Druck wesentlich gesteigert wird (4).

Während der Schwangerschaft erfolgt eine enorme Zunahme der Kollagenkonzentration im Uterus des Menschen bis auf das Sechs- bis Siebenfache des Ausgangswertes (51).

Am Ende der Schwangerschaft ist der Kollagengehalt des Corpusgewebes, bezogen auf das Feuchtgewicht, nur noch halb so groß, wie der von nichtschwangeren Säugetieren (5).

Im Collum uteri entspricht der Kollagengehalt am Ende der Tragzeit ebenfalls nur etwa der Hälfte desjenigen Nichtschwangerer (49).

Das Verhältnis von Grundsubstanz zur Fasermenge beträgt 1,5:1,0 (Corpus) bzw. 2,5:1 (Cervix), in der Gravidität 3:1 bzw. 5:1 (49,4).

Im graviden Uterus beträgt der Kollagengehalt in der Cervix 225,5 mg/g, im Corpus 169,7 mg/g Trockengewebe beim Menschen, 288,0 mg/g Trockengewebe bei der Ratte (4,15).

Entsprechende Werte für Kaninchen ließen sich in der zugängigen Literatur nicht finden.

Die schwangerschaftsbedingte (relative) Abnahme des Kollagengehaltes in der Gewichtseinheit bedeutet, daß das Gesamtkollagen des Uterus mit dem Schwangerschaftswachstum wesentlich geringer zunimmt als es der Gewichtszunahme des Organs entsprechen würde (Abb.1) (45).

Dies bedeutet, daß der Gesamtkollagengehalt des Uterus nicht parallel seinem Gesamtgewicht zunimmt.

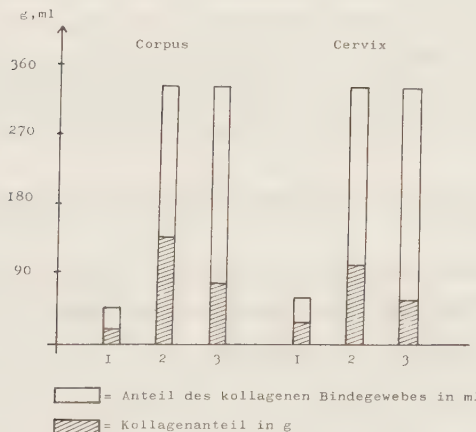


Abb.1 Tatsächliche Zunahme des Kollagengehaltes von Corpus und Cervix uteri in der Gravidität(3) im Vergleich zum erwarteten Zuwachs(2) bei Abnahme eines dem Gewicht parallelen Anwachsens des Ausgangswertes(1). (Strauss 1969)

1.3.1 Involution des Uterus

Beim Menschen ist schon nach etwa zwei Wochen fast alles Kollagen abgebaut, was während 38 Wochen Schwangerschaft aufgebaut wurde (4,31,52).

Der Kollagenabbau ist also ein sehr schnell verlaufender Prozeß.

Nach Cretius (4) und Woessner (52) tritt der Abbau des Uteruskollagens bei der Frau schon 14 Stunden post partum ein und ist nach zehn Tagen so weit fortgeschritten, daß nur noch 75% des Kollagengehaltes am Geburtstermin vorhanden sind.

Nach Woessner (53) setzt bei der Ratte 18 Stunden nach dem Werfen ein starker Kollagenabbau ein, der nach 100 Stunden abgeschlossen ist.

Bei der Ratte sinkt sogar der Kollagengehalt am vierten Tag post partum unter das normale Niveau (overshoot), um sich später wieder einzupendeln (46).

Die Möglichkeiten des Kollagenabbaues sind folgende (46):

1. Denaturierung des Kollagens durch unspezifische Proteasen im extrazellulären Raum.
2. Abbau durch spezifische Kollagenase.
3. Phagozytose mit intrazellulären Abbauvorgängen wie 1 oder 1 und 2.
4. Alle unter 1-3 genannten Prozesse sind wirksam.

Die Phagozytose von Kollagenfibrillen konnte durch die Untersuchungen von Schwarz und Güldner (46) bewiesen werden.

Auffallend ist die Tatsache, daß diese Phagozytose vor allem im Myometrium aber kaum im Endometrium gefunden wurde.

Das nur seltene Vorkommen von Fibrilleneinschlüssen im Endometrium mag darauf beruhen, daß hier der Gehalt an reifem Kollagen wesentlich geringer ist als im Myometrium. Dies gilt auch für den Zustand des Uterus ante partum (46).

Auf welche Weise das jüngere Kollagen abgebaut wird ist noch unklar.

Es kann eine Phagozytose von Filamenten nicht bestätigt aber auch nicht bestritten werden (46).

Die Halbwertszeit unreifen Kollagens ist nach Neuberger (33) derart kurz, daß man für den Uterus post partum auch einen extrazellulären Abbau vermuten kann.

Dies gilt auch besonders für die Regionen in denen keine Phagozytose vorkommt, z.B. das Endometrium.

Da nun die Halbwertszeit älteren Kollagens, das sich von jüngerem durch größere Fibrillendicke, stärkere Vernetzung und durch eine geringe Löslichkeit unterscheidet, weit länger dauert als die Zeit, in welcher der Kollagengehalt des Uterus normale Werte erreicht, ist man geneigt, die Phagozytose zumindest für das reife Kollagen als notwendig und für das Gesamtgeschehen als mitverantwortlich zu erachten (46).

Für das neutralsalzlösliche Kollagen gilt als sicher, daß schon bei Körpertemperatur eine Denaturierung stattfindet, bei der auch unspezifische Proteasen wirksam werden können (16).

Neben der Kollagenase, die das native Kollagen anzugreifen vermag, gibt es noch andere Enzyme, die am Kollagenabbau mitwirken.

Hier stehen im wesentlichen Beiträge von Woessner, Schaub und Cretius zur Verfügung.

Woessner (53) untersuchte das Verhalten mehrerer Enzyme im Uterus während und nach der Schwangerschaft.

Nach Woessner erhöht sich der Gehalt an Kathepsin und β -Glucuronidase nach dem Partus auf das drei- bis vierfache, an β -Galactosidase und saurer Phosphatase auf das zwei- bis dreifache (51).

Während der Uterusrückbildung sind zwei Kathepsin-Aktivitäten nachweisbar (ph optima bei 3,5 und 8,5); (Abb.2); (53).

Aktivitäten

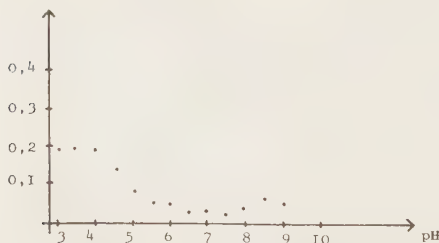


Abb.2

Kathepsinaktivitäten bei 37° während der Involution des Uterus (willkürliche Einheiten) (53).

Die Konzentration der genannten Enzyme steigt während der ersten vier Tage post partum linear an und erreicht ein Maximum zu der Zeit, in der das Feuchtgewicht und der Kollagengehalt ihren niedrigsten Stand erreicht haben (53).

Schaub (45) ließ Extrakte aus dem Uterus gegen Ende und nach der Schwangerschaft auf Kollagen einwirken und fand, daß ein Abbau bei saurem pH stattfand.

Er verglich ferner die Enzymaktivitäten von Uterus-extrakten mit der Aktivität von Extrakten aus der sogenannten "Glandula myometralis", die das Relaxin produzieren soll. Danach hat das Enzym hier zwar eine größere spezifische Aktivität, doch weist das im Uterus befindliche Enzym eine größere Affinität zum Substrat auf.

Die Existenz einer spezifischen Kollagenase ist aber durch die Befunde von Schaub noch nicht bewiesen.

Cretius (4,6) glaubt, daß das Bindegewebe der Uteruswand schwangerschaftsspezifischen Umwandlungen unterliegt, die ihren Ausdruck finden in einer Veränderung der interstitiellen Grundsubstanz.

Der biologische Kollagenabbau erfolgt zumindest in zwei Stufen.

In der ersten Phase wird Kollagen durch möglicherweise heterogene Einflüsse so verändert, daß es in der zweiten Phase durch körpereigene Proteasen wie Trypsin beschleunigt abgebaut werden kann (44,46).

Durch den Anstieg an freiem Hydroxyprolin im Serum läßt sich dieser Abbau des Uteruskollagens zeigen.

Die Frage nach der Steuerung dieser Abbauvorgänge ist gleichfalls noch weitgehend ungeklärt. Vieles spricht jedoch dafür, daß Hormone dabei eine Rolle spielen.

So konnte Houck (23) nachweisen, daß nach Gaben von Prolactin ein starker Kollagenabbau (Rattenhaut) einsetzt.

Es wäre möglich, daß auch die Ausschüttung des Prolactins den überschießenden Abbau des Kollagens induziert und möglicherweise aufrecht erhält.

Erst nach Beendigung der Lactation, mit dem Wiederbeginn des Oestrus nämlich, scheint die endgültige Restitutio uteri ad integrum zu erfolgen (13).

1.4. Fragestellung Anlaß zur Beschäftigung mit der Frage, welche Veränderungen sich während der postpartalen Involution des Uterus abspielen, gab der Exitus einer 23 jährigen IV.para, die durch eine spontane Uterusperforation bei Endometritis puerperalis verstarb.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte geklärt werden, in wie weit der Kollagenabbau im Uterus einen Einfluß auf den Anstieg des Serumhydroxyprolins post partum hat.

Außerdem sollte untersucht werden, wie rasch die postpartale Kollagenrückbildung im Uterus der Kaninchen

verläuft und wie die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration post partum beeinflusst wird, wenn nach dem Partus der Uterus exstirpiert wurde.

Auf der Suche nach der Ursache des während der Schwangerschaft zunehmenden Uterusgewichtes, sollte untersucht werden, inwieweit eine rein mechanische Dehnung durch die im Uterus enthaltenen Feten die Gewichtszunahme beeinflusst.

2.0 Hydroxyprolinbestimmung und Tierversuche

2.1 Methode der Hydroxyprolinbestimmung

Die erste Bestimmung von Hydroxyprolin wurde 1933 von Lang angegeben (28).

Weitere Methoden wurden von Bear, Kulonen, Neumann und Logan entwickelt (26,34), die dann 1958 von Stegemann modifiziert wurde (47), indem er die Oxydation des Hydroxyprolins nicht in alkalischer sondern in schwach saurer Reaktion in Acetat-Citrat-Puffer pH=6,0 vollzog.

Die Bestimmung von Hydroxyprolin wurde in den Untersuchungen nach der Methode von Stegemann, modifiziert nach Rauskolb durchgeführt (38,47).

Hydroxyprolin wird hier in einem schwach sauren Puffer (Acetat-Citrat-Puffer, pH 6,0) durch Chloramin T in Pyrroll umgewandelt (Oxydation) und dies in starker Perchlorsäure (70%) mit p-Dimethylaminobenzaldehyd umgesetzt. Perchlorsäure zersetzt das überschüssige

Chloramin T und bereitet damit die Komplexbildung mit dem Farbstoff vor.

Der Fehler bei dieser Methode der Hydroxyprolinbestimmung soll nach Neumann-Logan (34) und Rauskolb (38) bei $\pm$ 5% liegen.

Die Untersuchungen von Rauskolb ergaben, daß bei der Filtration durch Aktivkohle der Hydroxyprolinverlust bis zu 20% beträgt, während eine Filtration durch einfache Papierfilter ausreicht und keine Verfälschung der Ergebnisse bringt (34).

Wichtig ist, die Chloramin T Lösung lichtgeschützt (am besten in einer braunen Flasche), kühl (4° C) und nicht länger als sieben Tage aufzubewahren, da diese Lösung schnell zerfällt. Am besten sollte die Lösung nur in frischem Zustand verwendet werden.

2.2. Tierversuche

Zur Untersuchung standen 28 weibliche Kaninchen eines Inzuchtstammes "gemischte Sorten" im Alter zwischen sechs und sieben Monaten zur Verfügung.

Die Haltung dieser Tiere war standardisiert hinsichtlich:

- a) Raum (Licht, Temperatur, Lüftung)
- b) Stall (Größe, Reinigung)
- c) Fütterung (Zeit, Fertigfutter)

Die 28 Kaninchen wurden in zwei Gruppen geteilt, die wie folgt behandelt worden sind.

Gruppe I:

14 Kaninchen, die nach 31 tägiger
Tragzeit ihre Feten geworfen haben.
Am Uterus der Tiere wurden keine
Eingriffe vorgenommen.

Gruppe II:

14 Kaninchen, die nach 31 tägiger
Tragzeit ihre Feten geworfen haben
und innerhalb zwei Stunden post
partum den Uterus mit der Cervix
exstirpiert bekamen.

Die Narkose zur Operation leitete eine Injektion
von eins maximal bis zwei ml, je nach Konstitution
des Kaninchens, Evipan-Natrium ein.

Mit Äther konnte eine eventuell nötige Verlängerung
der Narkose erzielt werden.

Eine Exstirpation der Uteri zusammen mit der Cervix
wurde nach einem etwa sechs Zentimeter langem längs
geführten Bauchschnitt vorgenommen.

Nach der Operation wurde der Uterus von der Cervix
abgetrennt, beide Teile dann von noch anhaftendem
Bindegewebe befreit und anschließend getrennt gewogen
und ihr Volumen bestimmt.

Diese Messung sollte eine eventuell bestehende Korela-
tion zwischen dem Uterusgewicht (bzw. Volumen) und
der im Uterus enthaltenen Feten ermitteln.

Die Nähte wurden mit Catgut Nr.2 gemacht; die Haut-
wunde wurde mit Zwirn 25 geschlossen.

2.3. Blutgewinnung

Zur Bestimmung von Hydroxyprolin nach der Methode von Stegemann ist eine Menge von mindestens zwei ml. Serum notwendig. Um eine solche Menge zu gewinnen, braucht man ungefähr fünf ml. Blut.

Betty J. Sanders hat ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, den Kaninchen größere Mengen Blut aus den Ohrvenen zu entnehmen, ohne die Tiere dabei wesentlich zu gefährden (42).

Auf Grund der Tatsache, daß diese Apperatur, die eine Spezialanfertigung darstellt, nicht vorhanden war, kam diese Methode hier nicht zur Anwendung.

Das Blut ist durch Herzpunktion entnommen worden.

Um Tagesschwankungen entgegenzuwirken, wie sie für den Menschen nachgewiesen worden sind (31), wurde das Blut täglich zur selben Uhrzeit entnommen.

Während der ersten Woche post partum ist jeden Tag, später im Abstand von zunächst einer und dann drei Wochen Blut entnommen worden.

Das entnommene Blut wurde zentrifugiert (ca. 2000 Umdrehungen/min), das Serum abpipettiert und zur späteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

Bei dieser Temperatur ist das Serum über Wochen haltbar (31).

Durch die intracardiale Punktion entstand ein frühzeitiger Verlust an Kaninchen, so daß zur späteren statistischen Auswertung noch 22 Kaninchen zur Verfügung standen.

2.4. Hydroxyprolin- bestimmung

Es wurde ein bewährtes Verfahren angewandt, das von Stegemann beschrieben und von Rauskolb modifiziert wurde.

Diese Methode gestattet, ohne Störungen durch andere Aminosäuren Hydroxyprolin zu bestimmen.

2.4.1 Reagenzien

1. 0,05 m Chloramin T Lösung: (Merck 2426)

2,82 g p-Toluolsulfonchloramid-Natrium p.a. werden in 40 ml kaltem Aqua dest. gelöst, 60 ml dest. Methylglykol und 100 ml Acetrar-Citrat-Puffer zugegeben und geschüttelt. (Haltbar in brauner Flasche und 4°C: 7 Tage)

2. Acetrar-Citrat-Puffer (ph 6,0):

In 500 ml Aqua dest. werden gelöst: 50,0 g Citronensäure, 1 H₂O p.a. (Merck 244), 12 ml Eisessig (20°), 120 g Natriumacetat*3 H₂O p.a. (Merck 6265) und 34 g Natriumhydroxyd p.a. (Merck 6495). Die Mischung wird auf 1.000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, mit einigen Tropfen Toluol versetzt und geschüttelt.

3. 4-m Perchlorsäure:

286ml 70% Perchlorsäure (Merck 519) werden auf 500 ml Aqua dest. aufgefüllt.

4. p-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck 3057)

20 g p-DMPA werden in 200 ml Methylglykoll (Merck 858) gelöst.

5. L-Hydroxyprolin-Standardlösung:

5,0 mg L-Hydroxyprolin werden in 100 ml n/1000 HCL gelöst. (L-Cpro: Merck 4506).

Die Stammlösung wird für die Eichlösung wie folgt verdünnt:

<u>Standardlösung (ml)</u>	<u>n/1000 HCL (ml)</u>	<u>Konz. (mcg/ml)</u>
0,2	1,8	5
0,4	1,6	10
0,6	1,4	15
0,8	1,2	20
1,0	1,0	25

6. 32%ige Natronlauge zur ph-Einstellung

(Merck 5590)

7. 25%ige HCL zur Hydrolyse (Merck 316)

2.4.2 Geräte

1. Photometer Eppendorf
2. Filter (578 nm)
3. Normalküvetten
4. Reagenzgläser, Trichter, Filterpapier (Selecta 589/1)
5. Reagenzgläser NS 19, Pyrex, 30 ml mit Stopfen, Alu-Haken und Federn, Ringmarke bei 10 und 20 ml (zur Hydrolyse)
6. Vollpipetten 2 ml und automatische Eppendorf- Pipetten 1 ml, da lediglich mit vollen Millilitern gearbeitet wurde.
7. Wasserbad 60°
8. ph-Meter (Auto-Bürette)

2.4.3 Analysen- gang

1. Hydrolyse

2,0 ml Serum werden mit 2,0 ml 20%iger Salzsäure in dem Hydrolysekölbchen versetzt und die Kölbchen mittels des Stopfens und des Federringes verschlossen.

Die Hydrolyse erfolgt bei 110°C für die Dauer von 16-20 Stunden, da erst innerhalb dieses Zeitraumes die Hydrolyse vollständig ist, d.h. das Kollagen-eiweiß ganz aufgeschlossen ist und die reaktiven Gruppen am Hydroxyprolinmolekül freigesetzt werden.

2. Filtration

Nach abgeschlossener Hydrolyse wird das so entstandene bräunliche Hydrolysat abgekühlt und die darin enthaltenen braun-schwarzen Flocken (Anteil von Huminkohle) abfiltriert.

3. pH-Einstellung

Da die Reaktion auf Hydroxyprolin in schwach saurem Milieu durchgeführt wird, muß das stark saure Hydrolysat mittels 32% Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt werden.

Diese Einstellung erfolgt in diesem Falle mit der Autobürette.

Danach wird das Hydrolysat mit Acetat-Citrat-Puffer (pH 6,0) auf 10 ml verdünnt.

4. Reaktion auf Hydroxyprolin

a) 2,0 ml werden von dem verdünnten Hydrolysat entnommen und mit 1,0 ml Chloramin T versetzt, geschüttelt und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit erfolgt die Oxydation des Hydroxyprolins zu Pyrrol.

b) Zugabe von 2,0 ml 4m Perchlorsäure, schütteln und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
Zersetzung des Chloramin T, damit Stop der Oxydation.

c) Zugabe von 1,0 ml p-DMPA, schütteln und in einem Wasserbad von 60°C 15 Minuten erwärmen (Farbkomplexbildung). Danach in Leitungswasser kurz abkühlen und sofort Extinktion messen.

5. Messung der Extinktion

Der rote Farbstoffkomplex hat zwei Absorptionsmaxima bei 530 nm und bei 560 nm.

Da dieser Farbstoff instabil ist, muß die Extinktion sofort gemessen werden. Bei dem vorhandenen Filter von 578 nm werden immer noch ausreichende Extinktionen gemessen. Die Messung erfolgt gegen einen Leerwert (2,0 ml n/1000 HCL; 1,0 ml Chloramin T; 2,0 ml 4 m Perchlorsäure; 1,0 ml p-DMPA)

Für die angegebene Menge ist eine Standardlösung geeignet, die 5,0 ml L-Hydroxyprolin in n/1000 HCL enthält. So lassen sich mittels der so erhaltenen Eichkurve mg Hydroxyprolin aus den Extinktionen ermitteln.

3.0 Ergebnisse Es sollen hier die Untersuchungsergebnisse besprochen werden, die sich bei der Kontrolle der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration post partum bei Gruppe I und Gruppe II ergaben.

Gleichzeitig sollte ermittelt werden, in wie weit das Uterusgewicht der einzelnen Kaninchen von der in ihnen enthaltenen Feten abhängig ist.

3.1. Auswertung der Ergebnisse

Die gefundenen Serum-Hydroxyprolin-Konzentrationen der beiden Gruppen I und II wurden in zwei Kurven (Abb.3 und 4), die sich bei der Aufzeichnung der Hydroxyprolinkonzentrationen gegen die Zeit ergaben, dargestellt.

Der Normalbereich der Serumhydroxyprolin-Konzentration war bei vier nicht schwangeren Kaninchen, denen an je zwei Tagen Blut entnommen wurde, mit $161,1 \mu\text{g/ml}$ (135-172) ermittelt worden.

Bei der Gruppe I fanden sich ante partum Serum-Hydroxyprolin-Konzentrationen von $61 \mu\text{g/ml}$. (54-73) (Tab.I, Abb.3).

Innerhalb der nächsten 24 Stunden stieg die Konzentration auf $66,7 \mu\text{g/ml}$. (55-90) an.

Am zweiten und dritten Tag war die Konzentration auf $77,3 \mu\text{g/ml}$. (65-91) und $81,8 \mu\text{g/ml}$ (66-94) angestiegen, sank am vierten Tag auf $77,8 \mu\text{g/ml}$ (64-89) und nahm dann vom fünften Tag stetig zu.

Am sechsten und siebten Tag post partum erreichte die Konzentration 101,1 (72-148) $\mu\text{g/ml}$ und 91,6 $\mu\text{g/ml}$ (72-111) und schließlich nach zwei Wochen einen Wert von 134,8 $\mu\text{g/ml}$ (76-182).

Die Konzentration stieg weiter bis auf 145,8 $\mu\text{g/ml}$. (90-180) und erreichte damit nach drei Wochen etwa den Normalbereich.

Die ersten Werte wurden frühestens zehn Stunden post partum ermittelt.

Die Konzentrationen lagen zu diesem Zeitpunkt bei den 24 Stunden Werten.

Zusammenfassend ergab sich ein Ansteigen der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration um das Zweieinhalbfache vom Zeitpunkt der Geburt bis drei Wochen post partum.

Bei der Gruppe II fand sich ante partum eine Serumkonzentration von 66,7 $\mu\text{g/ml}$ (50-91) (Tab.II, Abb.4).

Die Konzentrationen waren am zweiten Tag 80,6 $\mu\text{g/ml}$ (66-109), am dritten Tag 86,8 $\mu\text{g/ml}$ (64-106), am vierten Tag 88,0 $\mu\text{g/ml}$. (68-106), am fünften Tag 92,5 $\mu\text{g/ml}$. (71-112), am sechsten Tag 96,8 $\mu\text{g/ml}$ (87-106) und am siebenten Tag 100,2 $\mu\text{g/ml}$. (91-108).

Nach drei Wochen post partum war die Konzentration auf 112,3 $\mu\text{g/ml}$. (98-130) angestiegen.

Hier war zum erstenmal eine sehr deutliche Differenz in der Serumkonzentration der Gruppen I und II zu erkennen.

Gruppe II erreichte nicht schon nach drei Wochen den Normalbereich, sondern lag hier etwa um $35 \mu\text{g/ml}$ unter dem Vergleichswert der Gruppe I.

Erst sieben Wochen post partum erreichte die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration einen Wert von $178,0 \mu\text{g/ml}$. (152-198) und lag damit wieder im Normalbereich.

Der Vergleich der Uterusgewichte mit der in ihnen enthaltenen Anzahl von Feten ergab folgende Ergebnisse (Tab.III).

Die kleinste Anzahl von Feten die hier in der Versuchsreihe von den Kaninchen geworfen wurden, betrug vier Feten. Das Uterusgewicht ist hier mit 28,5 g Feuchtgewicht gemessen worden.

Bei einer Zahl von fünf geworfenen Feten betrug das Uterusfeuchtgewicht 32,0 g. Bei sechs geworfenen Feten wurde ein Uterusfeuchtgewicht von 31,5 g und einmal ein Gewicht von 49,6 g ermittelt.

Bei sieben geworfenen Feten betrug das Gewicht 40,6 g und einmal 32,9 g und bei acht Feten 39,0 g und einmal 36,5 g.

Die höchste Zahl von Feten die in der Versuchsreihe geworfen worden sind betrug elf Feten. Das Uterusfeuchtgewicht war hier bis auf 54,0 g angestiegen.

Das Gewicht der Kaninchen, die hier zum Vergleich dienten, betrug im Mittel 3384,0 g (2900-3700).

Da das Gewicht bei allen Kaninchen fast identisch war und auch kein Altersunterschied bestand, konnte von diesen beiden Faktoren her das Uterusgewicht nicht unterschiedlich beeinflußt werden.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß mit zunehmender Zahl der Feten das Uterusgewicht ansteigt.

Zu diskutieren wäre, wie weit auf der einen Seite die rein mechanische Dehnung durch die Frucht in der Schwangerschaft oder von der Frucht selbst ausgehende lokal wirkende Substanzen an der Zunahme des Uterusgewichtes beteiligt sind.

5.2. Statistische Auswertung

a) Allgemeines

Um den Kurvenverlauf, der sich bei der Aufzeichnung der Hydroxyprolinkonzentration gegen die Zeit ergab, statistisch auszuwerten, d.h. zu untersuchen ob die gefundene Kurve, nämlich der Anstieg der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration postpartal, signifikant war oder aber rein zufällig zustande kam, wurde von den ermittelten Werten jedes Kaninchens und von jeder Gruppe eine Regressionsgerade errechnet.

Die Regressionsgerade ist die Gerade, bei der die Summe der Quadrate der Abstände (zwischen Gerade und Messpunkten) in der Richtung der Y-Achse möglichst klein wird.

Diese Regressionsgerade ist charakterisiert durch

$$Y = a + bx$$

wobei a dem Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse und b der Steigung der Geraden entspricht (40).

Die Berechnung der Regressionsgeraden bot sich zunächst vom optischen Bild der aufgezeichneten Werte her an.

Es sollte ferner ermittelt werden, ob eine Korrelation zwischen der gemessenen Hydroxyprolinkonzentration und der Zeit bei jedem Kaninchen und in jeder Gruppe besteht.

Beim Vergleich der Kurven von Gruppe I und Gruppe II wird eine einfache Varianzanalyse durchgeführt.

Die einfache Varianzanalyse beruht auf einem Mittelwertvergleich.

In diesem Fall geht man von einer sogenannten "Nullhypothese" aus, d.h. man postuliert, daß kein Unterschied zwischen dem Prüf- und dem Kontroll-Kollektiv vorliege, d.h. ein auffälliger Unterschied durch Zufall bedingt sei. (40).

Es muß nun durch die einfache Varianzanalyse ermittelt werden, ob die Hypothese abzulehnen ist oder nicht.

Zur einfachen Varianzanalyse werden hier für jede Gruppe die Regressionskoeffizienten (Steigung der für jedes Kaninchen errechneten Regressionsgeraden b) der zugehörigen Kaninchen benötigt.

Die Rechenmaschine (Tischrechner WANG 700) druckte entsprechend ihrem Programm für die einfache Varianzanalyse folgende Werte aus:

Zwischen den Gruppen:

Innerhalb der Gruppen:

SAQ = Summe der Abweichungsquotienten

$f = F(m, n)$

MAQ = Mittlerer Abweichungsquotient

F-Wert = Quotient aus MAQ

Der F-Wert (m, n) wird aus einer Tabelle nachgeschlagen;

und zwar ist f zwischen den Gruppen m und f innerhalb der Gruppen n .

Ist nun der nachgeschlagene $F(m, n)$ Wert kleiner als der errechnete F-Wert, so kann mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese, d.h. daß die Abweichung der Regressionskoeffizienten zwischen den Gruppen zufällig sind, abgelehnt werden.

Die Rechenmaschine druckte entsprechend ihrem Programm für die lineare Regression folgende Werte aus.

Zunächst die Regressionsgerade

$y = a + bx$

ferner SAQ, MAQ, $f = F(m, n)$ und den F-Wert.

r = Korrelationskoeffizient

Der errechnete r -Wert gibt an, ob eine positive Korrelation zwischen dem x und dem y -Wert der Regressionsgeraden besteht.

Liegt eine positive Korrelation zwischen dem x und y-Wert vor, so strebt r gegen 1,0.

Bei völligem Fehlen der Korrelation wird $r = 0$.

Bei r-Werten über 0,7 kann man von einer hohen Korrelation sprechen.

Ist der Verlauf der Regressionsgeraden signifikant oder aber rein zufällig bedingt, erkennt man aus den F-Werten (F (m,n) und F-Wert).

Es ist f-Regression = m

f-Rest = n

Der Vergleich der F-Werte (nachgeschlagener F (m,n) Wert und F-Wert) zeigt, daß der Anstieg der Regressionsgeraden signifikant ist, wenn $F (m,n) < F\text{-Wert}$ ist.

Das Programm für die einfache Varianzanalyse und die lineare Regression wurde freundlicherweise vom Institut für medizinische Statistik zur Verfügung gestellt.

b) Auswertung

Für die Werte der Konzentrationen über eine Zeit von drei Wochen wurde bei der Gruppe I in acht Fällen ein $r > 0,9$ in einem Fall ein $r = 0,8409$ und ein $r = 0,7984$ gefunden.

Bei der Gruppe II fanden sich bei zehn Kaninchen r-Werte von $r > 0,9$ in einem Fall ein $r = 0,8707$.

Nach den so ermittelten Korrelationskoeffizienten ergibt sich für alle Kaninchen ein hoher Zusammenhang zwischen

der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration und der Zeit.

Aus dem Vergleich der F-Werte läßt sich bei allen Kaninchen eine Signifikanz des Kurvenverlaufs ermitteln.

Man kann mit 95%iger Wahrscheinlichkeit sagen, daß der Anstieg der Geraden bei allen Kaninchen von Null verschieden ist.

Bei allen Tieren war der nachgeschlagene f-Wert ($F(m,n) < F\text{-Wert}$).

Für die Gruppe I erhält man ein $r = 0,7395$ und für die Gruppe II ein $r = 0,8961$. Es besteht also innerhalb beider Gruppen eine hohe Korrelation zwischen der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration und der Zeit.

Der nachgeschlagene f-Wert ($F(m,n)$) betrug für die Tiere der Gruppe I $F(1,57) = 4,00$ und der errechnete F-Wert = 106,12.

Für die Tiere der Gruppe II ergab sich ein nachgeschlagener f-Wert $F(1,63) = 4,00$ und ein errechneter F-Wert von 357,68.

In beiden Gruppen ist also $F(m,n) < F\text{-Wert}$.

Der Kurvenverlauf ist also in beiden Fällen signifikant und mit 95%iger Wahrscheinlichkeit ist der Anstieg der Geraden von Null verschieden.

Die einfache Varianzanalyse zwischen den Gruppen I und II ergab, daß der nachgeschlagene f-Wert $F(1,16) = 4,49$ kleiner als der errechnete F-Wert = 8,5034 ist.

Mit 95%iger Wahrscheinlichkeit kann man also die "Nullhypothese", d.h. daß kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen vorliege, ablehnen.

Die Abweichung der Regressionskoeffizienten zwischen den Gruppen sind also nicht zufällig bedingt.

Es wird also das bestätigt, was man schon anhand der Regressionsgeraden sieht, nämlich daß die Steigung beider Geraden voneinander abweicht.

Die Regressionsgerade der Gruppe I verläuft wesentlich steiler ($m=3,0081$) und erreicht folglich auch schneller den Normalbereich nach drei Wochen, als die Gruppe II mit einer Steigung von ($m=1,8115$), die erst nach etwa sieben Wochen zum Normalbereich zurückkommt.

Die Fehlerbreite bei Mehrfachbestimmungen von Eichkurven wurde mit $\pm 2,5\%$ bis $\pm 6,5\%$ ermittelt.

Sie stimmt damit ungefähr mit der in der Literatur angegebenen Fehlerbreite von $\pm 5\%$ überein.

Beim Vergleich der Uterusgewichte mit der in ihnen enthaltenen Anzahl von Feten ergaben sich aus der statistischen Auswertung folgende Ergebnisse.

Der Korrelationskoeffizient bei der linearen Regression betrug $r = 0,7094$.

Es besteht also ein hoher Zusammenhang zwischen der Anzahl der geworfenen Feten und dem Uterusgewicht.

Aus der Regressionsgeraden, die mit einer Steigung von $m=3,0158$ verläuft, läßt sich sehr gut eine

nahezu lineare Abhängigkeit der geworfenen Feten mit dem Uterusgewicht entnehmen.

Der Zu- oder Abnahme des Uterusgewichtes ist nach oben sowie nach unten eine Grenze gesetzt. Dies läßt sich aus dem in der Gleichung der Regressionsgeraden errechneten t -Wert von 17.5128 nach unten und die logischerweise nach oben begrenzte Zahl von im Uterus enthaltenen Feten entnehmen.

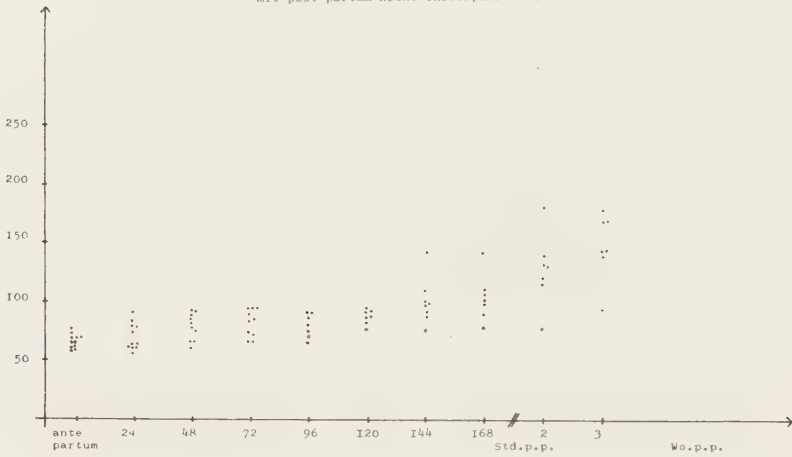
Der f -Wert wurde mit $F(1,7)=5,59$ abgelesen. Vergleicht man ihn mit dem errechneten F -Wert=7,09, so kann man sagen, daß der Verlauf der Regressionsgeraden signifikant ist und mit 95%iger Wahrscheinlichkeit von Null verschieden ist.

3.2.1 Zusammenstellung von Abbildungen und
Tabellen

Hydroxyprolin/ml Serum

Abb. 2

Aufzeichnung der Serumhydroxyprolinkonzentrationen bei Kaninchen
mit post partum nicht exstirpierten Uteri



Kanin.	ante	I.Tg.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	2Wo.	3Wo.
Nr.	partum	p.p.	-	-	-	-	-	-	-	-

I	54	56	65	66	80	76	72	78	76	90
2	55	55	65	66	64	92	84	85	132	147
3	55	72	88	74	72	78	98	103	117	180
4	57	57	61	73	68	95	96	111	145	170
5	64	64	75	89	84	89	98	148	182	170
6	64	58	74	84	88	86	87	98	125	141
7	70	76	91	94						
8	60	63	79	84	89	87	110	105	132	147
9	64	76	84	94						
10	69	83	91							
11	73	90	91	94			100			

Tab.I

Übersicht über die Serumhydroxyprolinkonzentrationen bei Kaninchen mit post partum nicht exstirpierten Uteri.

Hydroxyprolin/ml Serum

Abb. 4

Aufzeichnung der Serumhydroxyprolinkonzentrationen bei Kaninchen
mit post partum extirpierten Uteri



Kanin. Nr.	ante partum	I.Tg. p.p.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	2Wo	3Wo	7Wo
			-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	62	62	71	87							
2	71	88	100	113							
3	61	65	75	91	106	112					
4	62	66	66	71	78	88	100			117	180
5	50	61	78	80	94	110					
6	60	68	74	84	83	84	87	88	91	98	170
7	71	91	94	102	106	102	106	106	108	120	198
8	64	78	81	81	91	92	103	108		105	188
9	91	90	109	106	91	100	103	102		104	189
10	64	60	76	84	88	84	82	87		103	169
11	80	70	68	64	68	71	90	96		130	152
12	65	66	76	72	75	82	89				

Tab.II

Übersicht über die Serumhydroxyprolinkonzentrationen bei Kaninchen mit post partum exstirpierten Uteri.

Anzahl der Feten	4	5	6	6	7	7	8	8	11
Uterusgewicht	28,5	32,0	49,6	31,5	40,6	32,9	39,0	36,0	54,0 (g.)

Tab.III: Übersicht über das Uterusfeuchtgewicht bei der
jeweils im Uterus enthalten gewesenen Anzahl von
Feten.

Tabelle IV

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum nicht
exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.1

$$y = 1.1994 X + 64.1597$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	483.3601	1	483.3601	12.30
Rest	274.8621	7	39.2660	
Gesamt	758.2222	8		
r	0.7984			

Kaninchen Nr.2

$$y = 4.7708 X + 54.3819$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	7647.6458	1	7647.6458	109.72
Rest	487.9097	7	69.7013	
Gesamt	8135.5555	8		
r	0.9695			

Kaninchen Nr.3

$$y = 5.0625 X + 62.5625$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	8611.3125	1	8611.3125	65.04
Rest	926.6875	7	132.3839	
Gesamt	9535.0000	8		
r	0.9501			

Tabelle V

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum nicht
exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.4

$$y = 9.0064 X + 44.0909$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	9369.0048	1	9369.0048	254.51
Rest	220.8701	6	36.8116	
Gesamt	9589.8750	7		
r	0.9884			

Kaninchen Nr.5

$$y = 5.8499 X + 73.1380$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	10660.0162	1	10660.0162	14.49
Rest	4411.8587	6	735.3097	
Gesamt	15071.8750	7		
r	0.8409			

Kaninchen Nr.6

$$y = 2.0709 X + 74.4344$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	8345.7862	1	8345.7862	43.93
Rest	1139.7137	6	189.9522	
Gesamt	9485.5000	7		
r	0.9380			

Tabelle VI

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum nicht exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.7

$$y = 9.0000 X + 69.00000$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	162.0000	1	162.0000	6.75
Rest	24.0000	1	24.0000	
Gesamt	186.0000	2		
r	0.9332			

Kaninchen Nr.8

$$y = 4.2540 X + 70.6917$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	5137.3250	1	5137.3250	56.91
Rest	541.5499	6	90.2583	
Gesamt	5678.8750	7		
r	0.9511			

Kaninchen Nr.9

$$y = 8.5714 X + 67.4285$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	642.8571	1	642.8571	1124.99
Rest	1.1428	2	0.5714	
Gesamt	644.0000	3		
r	0.9981			

Tabelle VII

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum nicht exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.10

$$y = 2,0000 X + 87,9999$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	50,6666	1	50,6666	0,3955
Rest	0,00000	1	0,0000	
Gesamt	50,6666	2		
r	0,9999			

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.1

$$y = 12,5000 X + 48,3333$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	312,5000	1	312,5000	38,26
Rest	8,1666	1	8,1666	
Gesamt	320,6666	2		
r	0,9871			

Tabelle VIII

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum
exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.2

$$y = 12.5000 X + 75.3333$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	312.5000	1	312.5000	1874.99
Rest	0.1666	1	0.1666	
Gesamt	312.6666	2		
r	0.9997			

Kaninchen Nr.3

$$y = 12.5000 X + 52.3000$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	1562.5000	1	1562.5000	165.63
Rest	28.3000	3	9.4333	
Gesamt	1590.8000	4		
r	0.9910			

Tabelle IX

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum
exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.4

$$y = 1.9281 X + 70.7680$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	1678.3295	1	1678.3295	15.68
Rest	535.0990	5	107.0198	
Gesamt	2213.4285	6		
r	0.8707			

Kaninchen Nr.5

$$y = 11.4000 X + 51.5500$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	9.7806	1	9.7806	89.16
Rest	0.2193	2	0.1096	
Gesamt	10.0000	3		
r	0.9889			

Tabelle X

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum
exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.6

$$y = 1.6297 X + 72.4909$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	6726.3385	1	6726.3385	99.69
Rest	539.7614	8	67.4701	
Gesamt	7266.1000	9		
r	0.9621			

Kaninchen Nr.7

$$y = 1.8105 X + 91.0297$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	8084.4726	1	8084.4726	144.48
Rest	447.6273	8	55.9534	
Gesamt	8532.1000	9		
r	0.9734			

Kaninchen Nr.8

$$y = 1.8441 X + 80.0506$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	8366.8738	1	8366.8738	78.60
Rest	745.1261	7	106.4465	
Gesamt	9112.0000	8		
r	0.9562			

Tabelle XI

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.9

$$y = 1.7427 X + 90.8981$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	6200.1396	1	6200.1396	37.06
Rest	1003.7353	6	167.2892	
Gesamt	7203.8750	7		
r	0.9277			

Kaninchen Nr.10

$$y = 1.8627 X + 71.9879$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	7083.4717	1	7083.4717	109.70
Rest	387.4032	6	64.5672	
Gesamt	7470.8750	7		
r	0.9737			

Tabell. XII

Lineare Regression

Regressionsgeraden der Kaninchen mit post partum
exstirpiertem Uterus.

Kaninchen Nr.11

$$y = 1.7116 X + 67.2098$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	6269.8920	1	6269.8920	74.69
Rest	503.6079	6	83.9346	
Gesamt	6773.5000	7		
r	0.9621			

Kaninchen Nr.12

$$y = 3.8857 X + 63.0666$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	264.2285	1	264.2285	19.18
Rest	55.1047	4	13.7761	
Gesamt	319.3333	5		
r	0.9096			

Tabelle XIII

Regressionsanalyse bei mehrfachem y/x

Regressionsgerade der Kaninchen mit post partum
nicht exstirpiertem Uterus.

 $y = 3.0081 X + 73.4530$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	36687.2282	1	36687.2282	106.12
Linearitaet	10700.4298	10	1070.0429	3.09
Rest	19704.5448	57	345.6937	

Gesamt	67092.2029	68		
r	0.739471			

Regressionsgerade der Kaninchen mit post partum
exstirpiertem Uterus.

 $y = 1.8115 X + 78.3766$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	57724.4327	1	57724.4327	357.68
Linearitaet	3996.6036	17	235.0943	1.45
Rest	10167.2196	63	161.3844	

Gesamt	71888.2560	81		
r	0.896088			

Tab. III XIV

Einfache Varianzanalyse zwischen der Gruppe
und innerhalb der Gruppen.

	SAQ	f	MAQ	F-Wert
zw.Gr.	43.4484	1	43.4484	8.5034
in Gr.	81.7519	16	5.1094	
Summe	125.2003	17		
F (1 , 16) = 4,49				

Statistische Auswertung beim Vergleich der Uterusgewichte
mit der in ihnen enthaltenen Anzahl von Feten.

Lineare Regression

Uterusgewicht - Anzahl der geworfenen Feten

$$y = 3.0158 X + 17.5128$$

Varianz	SAQ	f	MAQ	F-Wert
Regression	299.1416	1	299.1416	7.09
Rest	295.1872	7	42.1696	
Gesamt	594.3288	8		
r	0.7094			

4. Diskussion Über den Aufbau des Kollagens sind bisher zahlreiche chemische und morphologische Arbeiten erschienen (16,24,46). Über seinen Abbau ist dagegen wenig bekannt.

Alle derzeitigen Nachweise des Skleroproteids Kollagen gehen von der Bestimmung der Aminosäure Hydroxyprolin aus, die im menschlichen Kollagen konstant in einer Menge von $13,4 \pm 0,24\%$ und nur hier enthalten ist (34).

Die Frage nach der Steuerung der Abbauvorgänge ist noch weitgehend ungeklärt. Vieles spricht jedoch dafür, daß Hormone dabei eine Rolle spielen (23,25,46).

Die in der Literatur angegebenen Methoden zur Bestimmung des Hydroxyprolins beziehen sich im wesentlichen auf die Methoden von Prockop und Udenfried (1960) sowie Stegemann (1958), die sich aus der Methode von Neumann und Logan (1950) entwickelten.

Zur Anwendung kam hier die Methode von Stegemann, die für das Sehnengewebe von Rauskolb (1967) modifiziert wurde.

Während der Schwangerschaft nimmt der Kollagengehalt des Uterus beim Menschen wie auch beim Säugetier bis zum Geburtstermin um ein Vielfaches zu.

Die postpartale Involution ist ein rascher Pro-

zeß im Vergleich zu der Zeit in der das Kollagen im Uterus aufgebaut wurde.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß post partum die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration nicht wie beim Menschen plötzlich ansteigt, und dann langsam auf den Ausgangswert wieder zurückkommt.

Die Kurven, die sich bei der Aufzeichnung der Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit für jedes Kaninchen ergaben, stimmten nicht mit denen überein, die bei Versuchen am Menschen gewonnen worden sind.

Nach dem in der Literatur angegebenen starken Abfall des Uteruskollagengehaltes post partum, wäre eine starke Zunahme der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration zu erwarten gewesen, die von einer bestimmten Anfangskonzentration aus ansteigt, einen Gipfel erreicht und nach einigen Tagen oder Wochen wieder zu dem Ausgangswert zurückkommt.

Bei den Kaninchen der Gruppe I, an denen keine operativen Eingriffe vorgenommen worden sind, steigt die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration post partum nur allmählich an, um nach etwa drei Wochen einen konstanten Wert zu erreichen, der ungefähr $100 \mu\text{g/ml}$ über dem Anfangswert bei der Geburt liegt und als normale Konzentration, die auch bei nicht schwangeren Kaninchen gemessen wurde, angesehen werden kann.

Mit einigen Zehnstundenwerten post partum, die alle bei den 24 Stundenwerten lagen, kann wohl ausgeschlossen werden, daß in dem Zeitraum bis 24 Stunden post partum ein "Peak" aufgetreten sein soll.

Die gefundenen Hydroxyprolin-Konzentrationen weichen insofern von den Untersuchungen von Cretius, Woessner und Michalek ab, als post partum kein "Peak" auftrat.

Zunächst muß gesagt werden, daß die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration bei nicht schwangeren Kaninchen etwa 100 $\mu\text{g/ml}$. höher liegen, als die bei beiden Gruppen zum Geburtstermin gefundenen Konzentrationen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß während der Schwangerschaft von 30 Tagen die Serumkonzentration gesunken sein muß.

Als Erklärung hierfür kann die Synthese von Kollagen, die während der Schwangerschaft enorm gesteigert ist, angeführt werden.

Hydroxyprolin, das neben Prolin und Glycin zur Kollagensynthese benötigt wird, wird vermehrt verbraucht.

Als Folge dieser erhöhten Kollagensynthese nimmt die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration ab.

Der Zeitpunkt, an dem die Serumkonzentration am niedrigsten ist, wird auch gleichzeitig der Zeitpunkt sein, an dem auch die Zunahme des

Uteruskollagengehaltes abgeschlossen ist.

Es bleibt zu untersuchen, wie und wie lange die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration während der Schwangerschaft abfällt und in welcher Weise ein Zusammenhang mit der Kollagen- oder Gewichtszunahme des Uterus besteht.

Aus dem oben Gesagten geht schon hervor, daß die Hydroxyprolin-Konzentration post partum nicht wie beim Menschen plötzlich ansteigt, um danach wieder allmählich auf den Ausgangswert zum Geburtstermin abzufallen. Nach Cretius und Woessner (4,52) müßte entsprechend dem raschen Kollagenabbau post partum eine plötzliche Zunahme der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration resultieren.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren weder bei der Gruppe I noch bei der Gruppe II eine überschießende Konzentrationszunahme post partum erfolgt ist.

Als Erklärung hierfür könnte man einen schon vor der Geburt einsetzenden Abbau des Uteruskollagens annehmen.

Da eine vermehrte Ausschüttung von Prolactin schon vor der Geburt einsetzt (25,36), welches einen starken Einfluß auf die Brutinstinkte hat und hier sowohl die Milchsekretion erhöht, wie auch eine Vermehrung des Gewebes der Brust-

drüse bewirkt, wäre es möglich, daß das Prolactin auch den Abbau des Kollagens ante partum induziert.

Houck konnte nachweisen, daß nach Gaben von Prolactin ein starker Kollagenabbau einsetzt (23).

Fainstat (13) vermutete, daß die Ausschüttung des Prolactins den Abbau des Kollagens induziert und möglicherweise aufrecht erhält.

Ein möglicher "Peak" wäre dann also schon vor der Geburt aufgetreten.

Die mechanische Schutzfunktion des Kollagens könnte in diesem Fall durchaus durch das während der Schwangerschaft hypertrophierte Myometrium mit übernommen werden.

Es ist die Aufgabe weiterer Untersuchungen abzuklären, ob schon ante partum oder unter der Geburt ein "Peak" aufgetreten ist.

Vergleicht man die Serumkonzentrationen von Gruppe I mit denen von Gruppe II post partum, so läßt sich kein wesentlicher Unterschied in der Konzentrationszunahme während der ersten sechs Tage post partum feststellen. Dieses Ergebnis könnte ebenfalls als Erklärung dafür dienen, daß schon ante partum ein überschießender Kollagenabbau eingesetzt hat, da andernfalls in der

Gruppe I in den folgenden Tagen post partum eine stärkere Zunahme der Serum-Hydroxyprolin-Konzentration im Vergleich mit der Gruppe II hätte erfolgen müssen.

Das unterschiedliche Erreichen des Normalwertes der Serumkonzentration beider Gruppen an zwei etwa drei Wochen voneinander getrennten Zeitpunkten, bei Gruppe I nach drei Wochen und bei Gruppe II etwa sechs Wochen, ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß das Hydroxyprolin, das beim Abbau des Uteruskollagens sich im Serum anhäuft bei Kaninchen der Gruppe II post partum durch die Exstirpation des Uterus nicht mehr zur Verfügung steht und somit eine längere Zeit verstreicht bis der Normalwert wieder erreicht werden kann.

In wie weit die Serumkonzentration post partum durch andere Faktoren beeinflusst wird, sei es durch Ausscheidung von Kollagenase oder Hydroxyprolin mit dem Wochenfluß oder aber durch erhöhten Abbau in der Leber sind Vermutungen, die näher zu untersuchen bleiben.

Eine stärkere Ausscheidung von Hydroxyprolin mit der Milch kommt während der Säugeperiode ebenfalls nicht in Betracht.

Die Gesamtproteinausscheidung in der Milch beträgt nach J.S. Davis $2,17 \pm 0,12$ g/100g (9). In der chemischen Zusammensetzung der Milch besteht vor und nach der Geburt kein großer Unterschied (3).

Es ist also unwahrscheinlich, daß während der Säugeperiode eine größere Menge an Hydroxyprolin über die Milch ausgeschieden wird, obwohl die Konzentration an Proteinen viermal so hoch ist wie in Kuhmilch (3,9).

Als Gegensatz zu den Untersuchungen von Woessner und Cretius konnte gezeigt werden, daß post partum kein überschießender Kollagenabbau eingesetzt hat, also post partum kein "Peak" zu sehen war, sondern eine kontinuierliche Zunahme der Serumkonzentration bis zum Normalwert, durch einen wahrscheinlich gleichmäßigen Kollagenabbau post partum, erfolgte.

Für das Erreichen der Normalkonzentration des Serumhydroxyprolins post partum ist wahrscheinlich nicht allein der Uteruskollagenabbau entscheidend, wie aus den Untersuchungen hervorgeht.

Bei der Gruppe II steht post partum das während der Schwangerschaft in den Uterus eingebaute Kollagen nicht mehr zur Verfügung. Nimmt die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration post partum trotzdem zu, so kann dies nicht die Folge eines im Uterus stattfindenden Kollagenabbaues sein.

Wahrscheinlich trägt hierzu das beim Abbau von Kollagen entstehende Hydroxyprolin bei, welches sich durch entzündliche Prozesse als Folge der vorgenommenen Eingriffe im Bindegewebe neu gebildet hat.

Cullen und Harkness (3) konnten an Ratten zeigen, daß allein schon die mechanische Dehnung die Kollagensynthese stimuliert, d.h. eine Gewichtszunahme des Uterus bewirkt, ohne daß hierzu die physiologischen Schwangerschaftshormone erforderlich wären. Dennoch spielen Östradiol, Relaxin und Progesteron bei der vermehrten Kollagenbildung in der Schwangerschaft eine Rolle, wie Cullen und Harkness (7) an nur mit diesen Hormonen behandelten Ratten zeigen konnten.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß mit zunehmender Zahl der Feten, d.h. mit einer Volumenzunahme, das Uterusgewicht ansteigt.

In wieweit eine Verbindung besteht zwischen dem Uteruswachstum und der Kollagenzunahme, läßt sich aus den Untersuchungen nicht klären. Strauss (49) konnte nachweisen, daß während des Schwangerschaftswachstumes der Kollagengehalt des Uterus nicht parallel seinem Gesamtgewicht zunimmt.

Wahrscheinlich spielt hier eine vermehrte Wassereinlagerung und eine Gesamtreaktion des Uterus, bei der es bei der Ratte wie beim Kaninchen zu einer Hypertrophie aller Schichten der Uteruswand kommt, eine Rolle (49,50).

Harkness und Harkness (21) zeigten, daß, wenn ein Horn einer schwangeren Ratte nicht mit Feten gefüllt ist und somit der Dehnungsreiz entfällt, trotzdem in der zweiten Schwangerschaftshälfte ein konstant erhöhter Kollagengehalt gegenüber dem Östrus-Wert bei nichtgraviden Kontrolltieren vorliegt.

Als Gegensatz zu diesem Befund konnte Gierlich (15) ebenfalls an Ratten zeigen, daß das Kollagen im ungedehnten Horn nicht wesentlich von dem Gehalt des entsprechenden gedehnten Kontrollhorns abwich.

Dieses ungedehnte Horn bleibt also völlig unbeeinflußt von dem Dehnungsvorgang im entsprechenden Kontrollhorn.

Dieser erhöhte Kollagengehalt im leeren Horn der graviden Ratte läßt sich daher vermutlich durch den Einfluß der Schwangerschaftshormone erklären, welche sowohl auf das gefüllte, als auch ungefüllte Horn wirken.

Wie die Ergebnisse -auch anderer Autoren- zeigen, nimmt also das Uterusfeuchtgewicht unter der Dehnung, d.h. hier mit steigender Zahl der Feten, zu.

Da bei allen Kaninchen die Stimulation der Kollagensynthese durch Geschlechtshormone wahrscheinlich gleich stark vorhanden ist, kann man diese nicht für die unterschiedliche Gewichtszunahme der Uteri während der Schwangerschaft verantwortlich machen.

Inwieweit von den Feten ausgehende lokal wirkende Substanzen auf das Uteruswachstum einwirken, konnte aus den vorliegenden Untersuchungen nicht näher ermittelt werden.

Es ist also zu vermuten, daß allein schon die mechanische Dehnung des Uterus eine verstärkte Kollagenbildung hervorruft, die allerdings nicht gleichzeitig parallel mit einer Erhöhung der Kollagenkonzentration verbunden ist.

5. Zusammen-
fassung

An post partum uterusexstirpierten und nicht uterusexstirpierten Kaninchen wurde die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration während der postpartalen Involution bestimmt.

Es sollte die Frage untersucht werden, wie rasch die postpartale Kollagenrückbildung im Uterus der Kaninchen verläuft und wie die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration post partum beeinflußt wird, wenn nach dem Partus der Uterus exstirpiert wurde.

Ferner sollte geklärt werden, inwieweit die rein mechanische Dehnung durch die Feten auf den Uterus eine Gewichtszunahme desselben bewirkt.

Den Tieren wurde innerhalb zwei Stunden post partum der Uterus exstirpiert und gewogen. Die Gewichte der Uteri wurden mit der Zahl der Feten verglichen.

Bei einer Kontrollgruppe wurde post partum der Uterus nicht exstirpiert.

Das Serum-Hydroxyprolin wurde nach der Methode von Stegemann, modifiziert nach Rauskolb, bestimmt.

Die normale Serum-Hydroxyprolin-Konzentration wurde an vier nicht schwangeren Kaninchen um 160 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt.

Bei der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe fanden sich ante partum Konzentrationen von ungefähr 60 $\mu\text{g/ml}$.

Ohne einen überschießenden Anstieg nahmen bei beiden Gruppen die Serumkonzentrationen post partum bis zum Normbereich kontinuierlich zu.

Die Kontrollgruppe erreichte die Normalkonzentration nach etwa drei und die Versuchsgruppe nach etwa sechs bis sieben Wochen post partum.

Der Verlauf der Kurven ist bei beiden Gruppen mit 95%iger Wahrscheinlichkeit von Null verschieden.

Eine hohe Korrelation zwischen dem X- und dem Y-Wert konnte bei allen Kaninchen nachgewiesen werden.

Die Frage, inwieweit eine rein mechanische Dehnung auf die Gewichtszunahme des Uterus einwirkt, konnte dahin beantwortet werden, daß allein die Dehnung des Uterus eine Gewichtszunahme hervorruft, an der wohl eine verstärkte Kollagenbildung beteiligt ist, die allerdings nicht mit einer Erhöhung der Kollagenkonzentration einhergeht.

6.0 LITERATURVERZEICHNIS

1. Blumenkrantz, N., Prockop, D.J.:
Variations in the Glycosilation of the
Collagen synthesized by chick embryo
cartilage.
Biochemica et Biophysica acta (1970)
208, 461-466
2. Bungenberg de Jong, H.G.:
Zit.nach A.W. Loeven,
Acta physiol.pharmacol.neerl.4, 243-273
(1955)
3. Coates, M.E., Margaret E.Gregory, Thompson, S.Y.:
The composition of rabbit's milk.
Brit.J.Nutr.(1964) 18, 583-586
4. Cretius, K., Hennig, K., Beier, G.:
Untersuchungen zur Löslichkeit und zum
Verhalten des Kollagens im nichtschwange-
ren und im schwangeren menschlichen Uterus.
Arch.Gynäk.203, 329(1966)
5. Cretius, K.:
Der Kollagengehalt menschlicher Uterus-
muskulatur.
Bibl.Gynäk.(1959) 20, 68-98
6. Cretius, K.:
Weitere Studien über die Beschaffenheit
des Uteruskollagens.
Geburtsh.u.Frauenheilk.26, 669(1966)

7. Cullen, B.M., R.D. Harkness:
Collagen Formation and Changes in Cell
Population in the Rat's Uterus after
Distension with Wax.
Quart.J.Exp.Physiol. 53, 33 (1968)
8. Cullen, B.M., R.D. Harkness:
Stimulation by distension of collagen
formation in the rat's uterus.
J.Physiol. 148, 6P-7P (1959), No. 1
9. Davis, J.S., Elsie M. Widdowson, R.A. McCance
The intake of milk and the retention
of its constituents while the newborn
rabbit doubles its weight.
Brit.J.Nutr. (1964) 18, 385-392
10. Dehl, R.E.:
Collagen: Mobile water content of
frozen fibers.
Science 170, 738-739 (1970)
11. Denton, D.A., Nelson, J.F.:
Effects of pregnancy and lactation on
the mineral appetites of wild rabbits.
Endocrinology 88:31, (1971)
12. Dempsey, M., Haines, B.M.:
Nature of the ground substance in the
interstitial connective tissue.
Nature (Land) 164, 368 (1949)
13. Fainstat, T.:
Extracellular studies of uterus
Amer.J.Obstet.Gynec. 91, 509-517 (1965)

14. Finlay, T.H., Adams, E.:
Kinetic and structural studies of
hydroxyproline 2-Epimerase.
Journal of Biological Chemistry 1970
No.20, 5248-5260
15. Gierlich, P.:
Der Kollagengehalt im gedehnten und
ungedehnten Uterushorn der ovariektomier-
ten und nichtovarektomierten Albinoratte.
Inaugural Dissertation Giessen 1970.
16. Grassmann, W.:
Kollagen. L.Zechmeister: Fortschritte der
Chemie organischer Naturstoffe.
Bd.23.195-293, Wien u. New York:
Springer 1965.
17. Gries, G., Lindner, J.:
Untersuchungen über den Kollagenabbau bei
akuten Entzündungen.
Zeitschrift für Rheumaforschung (1961)20,
122-125.
18. Hall, D.A.:
Changes in the properties of reconstituted
collagen brought about by mechanical
treatment. Nature 228,1314 (1970).
19. Hall, D.A., Read, R.:
Hydroxyprolin and thermal stability of
collagen.
Nature (1957) 180,243.

20. Harkness, M.L.R., Harkness R.D.:
The collagen content of the reproductive tract of the rat during pregnancy and lactation.
J.Physiol.(1954)123,492-500.
21. Harkness,M.L.R., Harkness,R.D.:
The distribution of the growth of collagen in the uterus of the pregnant rat.
J.Physiol.(1956)132,492-501.
22. Hertel,H., Schmitt,W.:
Spontane Uterusperforation bei Endomyometritis puerperalis durch erhöhten Kollagenabbau.
Arch.Gynäk.206,456(1968).
23. Houch,J.L.:
Catabolism of collagen
Science 148,1758-1959(1965).
24. Hurych,J., Nordwig,A.:
Biosynthese des Kollagens.
Leder(1965)16,60-65.
25. Karlson,P.:
Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag 1970.
26. Kulonen,R.:
Recent advances in the chemistry of collagen.
Asboe-Hansen, connective Tissues in health, in disease.
Copenhagen: Munksgaard(1954).

27. Laitinen, O., Nikkilä E.A., Kivirikko, K.F.:
Hydroxyprolin in the serum and urin.
Acta medica Scandinavica, 175, Part 2,
1966, 275-284.
28. Lang, K.:
Eine Mikromethode zur Bestimmung des
Prolins und Oxyprolins.
Zschr. physiol. Chem. 219, 149 (1933).
29. Langness, U.:
Hydroxyprolinausscheidung und Kollagen-
stoffwechsel.
Deutsche med. Wochenschrift (1970) 95,
2530-2535.
30. Meyer, K.:
Summary of recent progress in the chemistry
of connective tissue.
Amer. J. Med. 1, 676-679 (1946).
31. Michalek, H.E.:
Die Serum-Hydroxyprolin-Konzentration
während der postpartalen Involution.
Inaugural Dissertation Giessen, 1971.
32. Nemetschek, Th.:
Über die Bedeutung des Wassers für organi-
sche Strukturen, dargelegt am Beispiel des
Kollagens.
Med. Welt. Nr. 3, 21, (1970)
33. Neuberger, A., Perrone, J.C., Slack, H.G.B.:
The relative metabolic inertia of tendon
collagen in the rat.
Biochem. J. 49, 199, (1951).

34. Neumann, R.E., Logan, M.A.:
The determination of hydroxyprolin.
J.biol.chem.(1950)184,299-306.
35. Peterkofsky, B., Udenfried, S.:
Conversion of prolin to collagen hydroxy-
prolin in a cell-free system from a
chick embryo.
J.biol.chem.233,3966(1963).
36. Rapoport, S.M.:
Medizinische Biochemie
VEB, Berlin 1966
37. Prockop, D.J., Sjoerdsma, A.:
Significance of urinary hydroxyprolin
in man.
J.Clin.Investigation 40,843(1961).
38. Rauskolb, R.:
Untersuchungen zur Methodik der Bestim-
mung von Hydroxyprolin im Sehnengewebe.
Inaugural Dissertation Giessen, 1967.
39. Rivers, J.M., Krook, L., Cormier, A.:
Biochemical and histological Study of
Guinea pig fetal and uterine Tissue in
Ascorbic Acid Deficiency.
J.Nutr.100, No.2, 217-227(1970).
40. Richterich, R.:
Klinische Chemie
S.Karger, Basel-New-York 1968.

41. Rollhäuser, H.:

Funktionelle Anpassung der Sehnenfasern
im submikroskopischen Bereich.
Verh.anat.Ges.(Jena) 100, 313-322 (1953/54).

42. Sanders, B.J.:

Safe and rapid method for obtaining large
quantities of blood from the rabbit.
American Journal of Clinical Pathology
Dec. 1966, 6, 704-705.

43. Schaub, M.C.:

Distribution and variation of a collagen-
degrading enzyme in the uterus of pregnant
rats.
Experientia 20, No. 12, 675-676 (1964).

44. Schaub, M.C.:

A collagen degrading mechanism in the rat
uterus during post partum involution.
Helvet.physiol.pharmacol.acta 21, 227-233
(1963).

45. Schaub, M.C.:

Abbau von Kollagen durch einen Faktor im
Uterus.
Helvet.physiol.pharmacol.acta 22, C38-C40
(1964)

46. Schwarz, W., Güldner, H.:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen
des Kollagenabbaues im Uterus der Ratte
nach der Schwangerschaft.
Zeitschrift für Zellforschung 83, 416-426
(1967).

47. Stegemann, H.:

Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit
Chloramin T und p-Dimethylaminobenzal-
dehyd.

Zeitschrift für physiologische Chemie
Bd.311(1958) 41-45.

48. Stetten, M.R.:

Some aspect of the metabolism of hydroxy-
prolin, studied with the aid of isotopic
nitrogen.

J.biol.chem.181,31(1949).

49. Strauss, G.:

Funktionsbedingte Unterschiede der Fein-
struktur des kollagenen Bindegewebes
menschlicher Uteri.

Arch.Gynäk.208,147-177(1969).

50. Takacs, I., Verzar, E.:

Macromolecular aging of collagen III.
stimulation of collagen production in
the skin and uterus.

Gerontologia 14,126(1968).

51. Woessner, B.J.jr.:

Postpartum involution of the uterus.

Connective tissue framework OB/Cyen.

Gigest 10,44,1968.

52. Woessner, B.J.jr., Brewer, T.H.:

Formation and breakdown of collagen and
elastin in the human uterus during
pregnancy and post partum involution.

Biochem.J.99,75(1963).

53. Woessner, B.J. jr.:

Catabolism of collagen and non collagen
protein in the rat uterus during post
partum involution.

Biochem.J.(London)83,304-314(1962)No.2

54. Ziff, M., Kibrik, A., Dresner, E., Gribets, H.J.:

Excretion of hydroxyprolin in patients
with rheumatic and non rheumatic diseases.

J.clin.Invest.35(1956)579.

7.0 LEBENS LAUF

Am 13. August 1948 wurde ich, Alfred Münch, in Hümme als zweites Kind des prakt. Arztes Dr. Alfred Münch und dessen Frau Ursula, geb. Krieger, geboren

1955 wurde ich eingeschult und trat 1959 in die Albert-Schweitzer-Schule in Hofgeismar ein.

Nach bestandenen Abitur 1968 begann ich an der Freien Universität in Berlin mein Medizinstudium.

Nach bestandenen Vorphysikum 1969 wechselte ich an die Philipps-Universität in Marburg, wo ich 1971 meine ärztliche Vorprüfung ablegte.

Von 1971 bis 1974 studierte ich an der Justus Liebig-Universität in Giessen, heiratete 1972 meine Frau Annelie, geb. Dierkes und 1973 wurde unser Sohn Henning geboren.

Das klinische Studium beendete ich am 9. Juli 1974 mit dem Staatsexamen in Giessen.

